

## イネ 4 倍体の葯培養

高木 胖・岸川 英利・江頭 正義

(育種学研究室)

昭和56年11月26日 受理

### Anther Culture of Tetraploid Rice

Yutaka TAKAGI, Hidetoshi KISHIKAWA and Masayoshi EGASHIRA

(Laboratory of Plant Breeding)

Received November 26, 1981

#### Summary

It is well known that irregular distribution of chromosomes in the course of meiosis of autopolyploids such as autotetraploid plant gives rise to irregular chromosome numbers in the gametes. By means of anther culture of tetraploid rice, *Oriza sativa* L., these gametes have now been deficiently proven to differentiate into complete plants with various chromosome numbers.

Diploid ( $2n=24$ ) and its artificially induced tetraploid ( $2n=48$ ) rice plants (cv. Aikoku, Norin No. 8, Norin No. 29, Omachi, Sekitori, Sekiyama, Shinriki, Takara) were used in the study of anther culture. Media used for anther culture were the basic medium of Miller supplemented with 0.2–20 mg/l 2, 4-D. Effects of 2, 4-D concentrations on callus formation from tetraploid anther were investigated using 4X-Norin No. 29. The highest degree of callus formation was induced on the medium containing 2 mg/l 2, 4-D.

Callus formation of tetraploid plants are less successful than in diploid plants. The deviation was considered to be partly based on the difference in the pollen fertility. An average pollen fertility was 99 percent in diploid plant and 59 percent in tetraploid plant.

Difference in callus formation rates among varieties were also observed. Comparing with the callus formation rates between corresponding varieties of each ploidy level, any correlation were not found between corresponding varieties.

Many pollen plants induced from diploid and tetraploid anther were chlorophyll-deficient, as *albina* and *viridis*. About 50 percent of pollen plants were *albina* and the others were normal. The chlorophyll-deficiency was considered to be caused by physiological inhibition of chlorophyll formation.

Androgenetic progenies from the diploid plant mostly had 12 chromosomes. Androgenetic plants which were induced from the anther culture of tetraploid were segregated into several kinds of chromosome numbers such as 24, 25, 26, 48 and 51.

#### 緒 言

花粉の培養によって得られる半数体は、染色体の倍加によって容易にホモ化でき、交雑育種の効率向上に役立つところが大きく、葯培養による半数体の育成が多く試みられている<sup>3,5,6)</sup>。

一方、同質倍数体は減数分裂時における染色体の分離が不規則なため異数性の花粉を生ずる。このような花粉からの培養により植物体を得ることができれば、各種の異数性植物を一挙に得ることができ、遺伝育種学的研究材料として役立つところが大きいと思われる<sup>7)</sup>。

このような観点から、筆者らはイネの人為同質4倍体を用いて葯培養による異数性植物の育成を試みてきたが、本報告は、主に葯培養によるカルス形成率と植物体の分化について、2倍体と4倍との比較および品種間差異についての結果の概要を述べる。

### 実験材料および方法

イネ4倍体の葯からのカルス形成に最も良いと思われる2,4-D濃度を知る目的で、2,4-D濃度を0.2 mg/l から20 mg/l まで変化させた培地に、農林29号の4倍体からの葯を各処理区あて500~700個を置床して調べた。

農林29号の4倍体の葯培養の結果から、愛国、農林8号、農林29号、雄町、関取、関山、神力、宝の8品種について、2倍体とコルヒチン処理により倍加した4倍体について、2,4-D 2 mg/l を加えた培地で葯培養を行い、カルス形成率に関する品種間差異を調べた。4倍体品種で、カルス形成率、根・茎葉の分化率が高かったのは、愛国、農林29号、宝の3品種であった。2,4-D濃度との関係をより詳細に知る目的で、0.2 mg/l, 1 mg/l, 2 mg/l と濃度を変化させて葯培養を再度行なった。

葯培養は、Miller の培地にカルス形成のために2,4-Dを加え、1核期の花粉を含むと思われる葯を培養管当たり20個を置床して行なった。葯の培養は、カルス形成まで25°C 定温で暗黒下のもとで行ない、カルス形成後は、2,4-D を含まない Miller の培地に移し、長日条件下に置いた。分化した幼植物は、本葉が2~3枚に展開した時、パーミキュライトを培土とした鉢に移植し、自然条件下で水耕した。

## 結 果

### 1. 4倍体のカルス形成率および根形成率におよぼす2,4-D濃度

置床直後の黄色の葯は数日をおいて黒変し枯死したようにみえるが、早いもので置床後14日目には淡黄色のカルスの分化が認められ、その後、25日から45日にかけてカルスの分化率は最大となった。第1表は農林29号の4倍体の葯を培地に置床して90日目までのカルス形成率と、分化し

Table 1. Cullus formation from anthers of tetraploid Norin No. 29 on media supplemented with 2, 4-D, and effect of 2, 4-D concentration promoting on roots formation in cullus tissues

Concentration (mg/l)	No. of anthers cultured	No. of anthers forming cullus	% of anthers forming cullus	No. of cullus forming roots	% of cullus forming roots
0.2	613	8	1.3	3	37.5
1	473	7	1.5	2	28.6
2	601	16	2.7	5	31.3
5	596	7	1.2	1	14.3
10	620	1	0.2	0	0.0
20	632	2	0.3	0	0.0

たカルスを 2,4-D を含まない培地に移したときの根形成率を示したものである。2,4-D を含む培地によるカルス形成率は 0.2 mg/l から 5 mg/l の濃度で高く、2 mg/l で最大の形成率を示した。分化カルスからの根形成率は 0.2 mg/l から 2 mg/l までが良好であった。

## 2. カルス形成率の品種間差異

4 倍体と 2 倍体のそれぞれの 8 品種について 2 mg/l の 2,4-D を加えた培地におけるカルス形成率を示したのが第 2 表である。4 倍体と 2 倍体のカルス形成率を比較すると、4 倍体は平均 2.5%，2 倍体は平均 6.8% と、4 倍体のカルス形成率は 2 倍体のそれよりも低く、約半分以下であった。

カルス形成率の品種間差異について、4 倍体では 0.4～8.0%，2 倍体では 1.7～16.4% までの大きな差が認められた。2 倍体ではカルス形成率に品種間差異のあることがこれまで知られている<sup>1,9)</sup>。4 倍体について、2 倍体の農林 8 号のカルス形成率は 16.4% と高く、4 倍体では 1.5% と低くなっている。愛国では 2 倍体のカルス形成率は 3.2% で低いにもかかわらず、4 倍体では 8.0% と高い。したがって 2 倍体のカルス形成率の高い品種が 4 倍体でも高いとはかぎらず、両者の間の相関関係 ( $r = -0.139$ ) は認められなかった。

2 倍体と 4 倍体の品種の花粉稔性について、前者では 98% 以上であるのに、後者では最高の 79% から最低の 40% まで分布しており、平均すると 59% と低かった。4 倍体品種の花粉稔性とカルス形成率との間には相関関係 ( $r = -0.206$ ) は認められなかった。

## 3. 根形成率および茎葉形成率の品種間差異

カルスからの根と茎葉の形成率について 4 倍体と 2 倍体とを比較したのが第 3 表である。品種によって供試カルス数に多少があり、厳密な比較は困難であるが、根形成率について 4 倍体は 23.2% と低く、2 倍体の 54.2% の約半分であった。また各倍数性について品種間の変異巾は、4 倍体で小さく、2 倍体で大きかった。茎葉の分化率は根の分化率に比べて著しく低率であるが、4 倍体では 4.8%，2 倍体では 3.9% と、根形成率とは逆に 4 倍体での形成率が高い傾向にあった。この実験で茎葉を分化したのは、2 倍体で 12 個体、4 倍体で 24 個体であった。これら茎葉を分化した個体の約半数は葉緑体変異であり、そのほとんどはアルビノで、葉緑体変異の発生率は 4 倍体で 46.6%，2 倍体で 60.0% と倍数性によって大きく異なることはなかった。また 2 倍体と 4 倍体の薬培養にみられる高頻度の葉緑体変異の発生は、薬培養による健全な植物体の育成を大きく阻害している。

愛国、農林 29 号、宝の 4 倍体を用いて、2,4-D 濃度を变化させて培養した結果を第 4 表に示した。これはカルス形成率について、また茎葉形成率について品種によって適正な 2,4-D 濃度を異にするのではないかと考えたためである。カルス形成率について、いずれの品種も 2 mg/l の 2,4-D 濃度で最もカルス形成率が高かった。茎葉の分化について、0.2 mg/l, 1 mg/l の低い 2,4-D 濃度で比較的高い形成率であった。葉緑体変異について、宝ではアルビノ変異が少く、品種によって出現率を異にしていた。しかしながら、2,4-D の濃度によって、葉緑体変異の出現率に差は認められなかった。

2 倍体と 4 倍体の薬培養から、2 倍体について 5 個体、4 倍体について 10 個体の植物を育成することができた。2 倍体の薬培養からは 4 個体が半数体 ( $2n=12$ )、1 個体が 2 倍体であった。

Table 2. Varietal difference of callus formation from anthers on media supplemented with 2 mg/l 2, 4-D

Variety	Tetraploid				Diploid		
	Pollen fertility (%)	No. of anthers cultured	No. of anthers forming callus	% of anthers forming callus	No. of anthers cultured	No. of anthers forming callus	% of anthers forming callus
Aikoku	62.8	2033	163	8.0	1093	35	3.2
Norin No. 8	40.0	2392	36	1.5	703	115	16.4
Norin No. 29	64.5	4815	126	2.6	1004	97	9.7
Omachi	53.4	2033	20	1.0	821	48	5.9
Sekitori	79.0	2421	10	0.4	523	37	7.1
Sekiyama	51.2	1632	13	0.8	519	9	1.7
Shinriki	79.0	1914	11	0.6	825	55	6.7
Takara	43.1	2444	122	5.0	627	21	3.4
(Mean)	59.1	2461	63	2.5	764	52	6.8

Table 3. Varietal difference of roots and plantlets formation from callus

Variety	Tetraploid				Diploid			
	No. of callus cultured	No. of callus forming roots	% of callus forming roots	No. of callus forming plantlets	No. of callus cultured	No. of callus forming roots	% of callus forming roots	No. of callus forming plantlets
Aikoku	163	55	33.7	7 (4 <sup>a</sup> )*	27	14	51.9	0
Norin No. 8	36	7	19.4	0	71	33	46.5	2 (1 <sup>a</sup> )
Norin No. 29	126	47	18.1	11 (2 <sup>a</sup> +2 <sup>v</sup> )	80	42	52.5	2
Omachi	20	7	35.0	1	34	18	52.9	2 (2 <sup>a</sup> )
Sekitori	10	1	10.0	0	25	13	52.0	0
Sekiyama	13	2	15.4	0	6	3	50.0	0
Shinriki	11	4	36.4	1 (1 <sup>a</sup> )	44	27	61.4	4 (2 <sup>a</sup> )
Takara	122	21	17.2	4 (2 <sup>a</sup> )	13	8	61.5	2 (2 <sup>a</sup> )
(Mean)	63	18	23.2	3 (1.4)	38	20	54.2	1.5 (0.9)

\*) Figure in parentheses shows chlorophyll deficient type, a; *albina*, v; *viridis*

Table 4. Variation in frequency of callus and organ formation on media supplemented with different 2, 4-D concentration

Tetraploid variety	Concentration of 2, 4-D (mg/l)	No. of anthers cultured	No. of anthers forming callus	No. of callus forming roots	No. of callus forming plantlets	% of anthers forming callus	% of callus forming roots	% of callus forming plantlets
Aikoku	0.2	263	35	15	3 (2 <sup>a</sup> )*	13.3	42.9	8.6
	1	193	22	11	2 (2 <sup>a</sup> )	11.4	50.0	9.1
	2	333	48	17	3 (2 <sup>a</sup> )	14.4	35.4	6.3
Norin No. 29	0.2	3378	118	21	13 (8 <sup>a</sup> )	3.5	17.8	11.0
	1	3238	136	21	11 (5 <sup>a</sup> )	4.2	15.4	8.1
	2	3763	189	46	12 (9 <sup>a</sup> )	5.0	24.3	6.3
Takara	0.2	2170	133	28	6 (2 <sup>a</sup> )	6.1	21.1	4.5
	1	2048	160	29	4 (—)	7.8	18.1	2.5
	2	2205	187	37	7 (2 <sup>a</sup> )	8.5	19.8	3.7

\*) Figure in parentheses shows chlorophyll deficient type, a; *albina*

Table 5. Chromosome numbers of plant redifferentiated from pollen calluses

Tetraploid variety	24	25	26	48	51
Aikoku	1				
Norin No. 29	3	2	1	1	1
Takara	1				
(Total)	5	2	1	1	1

4倍体の葯培養から得られた植物体の染色体数を第5表に示した。分化植物体の多くは2倍体の染色体数 ( $2n=24$ ) を持つものであったが、他に  $2n=25, 26, 48, 51$  の染色体数を持つ異数性植物が出現した。

### 考 察

イネ2倍体の花粉からのカルス形成のためのオーキシン濃度について、大野<sup>9)</sup> は、 $1 \times 10^{-5} \sim 2 \times 10^{-5}$ モルの 2,4-D 濃度で高いカルス形成率を得ており、一般的に  $1 \sim 3 \text{ mg/l}$  の 2,4-D 濃度が多く用いられている。同質4倍体イネの葯培養においてもカルスの最高形成率を示す 2,4-D 濃度は、これらの報告とほぼ同様の  $2 \text{ mg/l}$  が最適であった。同質4倍体の葯培養におけるカルス形成に関する他の例として、林ら<sup>2)</sup> は、レンゲの同質4倍体の葯培養において、Murashige & Skoog の基本培地に種々の濃度の NAA, 2,4-D, IAA のいずれかを添加したものを培地とした。その結果、葯壁細胞からのカルス形成において、2倍体でカルス形成のみられない IAA 添加区で、4倍体では低率ながらカルスを形成し、倍数性による差異として興味あることを示した。しかし4倍体におけるカルス形成率では、2倍体と同様 NAA の  $1 \times 10^{-5}$ モルが最高であると報告している。これらのことからカルス形成に関して2倍体において最適の培地組成が、同質4倍体においても最適であると考えられる。

葯培養でのカルス形成率は品種によって異にしていた。カルス形成率の品種間差異は、Guha-Mukherjee<sup>1)</sup>、大野<sup>9)</sup> も同様のことを観察しており、遺伝子型の差に起因するものと考えられている。同一の遺伝子型を持つと思われる2倍体と4倍体の間のカルス形成率には密接な関係は認められなかった。これは4倍体における同一遺伝子の重複による生理的変化に基づくものであろう。また第一義的には4倍体の花粉稔性と葯当たりの花粉数が品種によって2倍体と大きく異なるためであると考えられる。

4倍体と2倍体の葯培養による再分化個体の中にはほぼ半数におよぶ葉緑体変異が出現した。これらの大部分はアルビノであり、葯培養の育種利用に大きな障害となっている。大野<sup>9)</sup> によれば、葯培養で出現するアルビノは78%と高い値となっている。これは誘発突然変異によるものか、あるいは 2,4-D が核または細胞質に作用して葉緑素形成を阻害した<sup>1,4,9,11)</sup> ものと考えられている。本研究では4倍体のカルスからも2倍体と同様にアルビノが高頻度に出現した。また4倍体の葯培養から得られた2倍体の後代ではアルビノを分離することはなかった。これらのことから、培養の過程に高頻度に出現する葉緑体変異は、カルス形成過程あるいは個体の再分化過程での葉緑素形成の阻害による非遺伝的変異であると考えられる。

培養カルス細胞にみられる染色体数の変異に関する報告は多い<sup>8,9,10)</sup>。染色体数の変異は培養花粉粒の染色体数に由来するものと、その後のカルスの細胞分裂と核分裂から出現する染色体の数的異常に起因するものとが考えられる。2倍体の葯培養からの分化個体では、多くは  $2n=12$  の

染色体を持つ半数体で、他は自然倍加による2倍体であった。本研究における4倍体の蒴培養では、2倍体と4倍体を、また他に、 $2n=25, 26, 51$ の染色体を持つ植物体を得た。得られた異数性植物は、花粉粒の染色体に由来するものであり、4倍体植物の不規則な減数分裂に起因するものと考えられる。倍数体の蒴培養からの異数性植物の誘導に関して、Niizeki ら<sup>7)</sup>はタバコ (*Nicotiana tabacum*,  $2n=48$ ) の倍数体の蒴培養において、3倍体 ( $2n=72$ ) から、26~41に分布する染色体数を有し、4倍体 ( $2n=96$ ) から、43~49に分布する染色体数を有する花粉起原の多数の異数性植物を育成している。このことから、倍数体の蒴培養により異数性花粉に起原する種々の異数性植物が比較的容易に育成できることが明らかとなった。

### 摘 要

1) 同質倍数体は減数分裂時における染色体の分離が不規則なためにしばしば異数性の配偶子を生じる。このような異数性配偶子のある4倍体イネ (*O. sativa* L.) の花粉を蒴培養することで完全な植物体を分化させることにより、種々の異数性の染色体を持つ植物の育成が可能であることが明らかとなった。

2) 2倍体 ( $2n=24$ ) のイネ品種 (愛国, 農林8号, 農林29号, 雄町, 関取, 関山, 神力, 宝) とそれらを人為的に倍加した4倍体 ( $2n=48$ ) を蒴培養に用いた。蒴培養は Miller の基本培地に 2,4-D を加えたものを用い、4倍体では 2 mg/l の 2,4-D を含む培地で最も高いカルス形成率を得た。

3) カルス形成率は倍数性によって異にしていた。4倍体は2倍体の約半分以下のカルス形成率であった。これは4倍体の花粉稔性が低いことが関与していると考えられる。2倍体の平均花粉稔性は99%, 4倍体では59%であった。

4) カルス形成率には品種間差異が認められた。しかしながら2倍体と4倍体との間には、カルス形成率に品種間の相関関係は認められなかった。

5) カルスからの莖葉の分化率は低く、4倍体では4.8%, 2倍体では3.9%であった。

6) 2倍体と4倍体の蒴培養による再分化個体の中には約半数の葉緑体変異個体が出現した。これらの大部分はアルビノであり、2倍体と4倍体ではほぼ同数出現したことから、誘発突然変異とは考えられず、カルス形成過程あるいは個体の再分化の過程での葉緑素形成の阻害に起因した非遺伝的変異であると考えた。

7) 2倍体の蒴培養からの分化個体のほとんどが  $2n=12$  の染色体を持つ半数体で、他は2倍体であった。4倍体の蒴培養からは、2倍体と4倍体、他に  $2n=25, 26, 51$  等の染色体を持つ異数性個体を得た。

### 引 用 文 献

- 1) Guha-Mukherjee, S. (1973). Genotypic differences in the *in vitro* formation of embryoids from rice pollen. J. Exp. Bot. 24: 139-144.
- 2) 林喜三郎・中村幸生 (1972). レンゲの2倍体および同質4倍体における蒴壁細胞からのカルス形成と植物体の分化 高知大研報 農学 21: 45-50.
- 3) Kameya, T. and K. Hinata (1970). Induction of haploid plants from pollen grains of *Brassica*. Japan. J. Breed. 20: 82-87.
- 4) Mohandas, T. and W. F. Grant (1972). Cytogenetic effects of 2, 4-D and amitrole in relation to nuclear volume and DNA content in some higher plants. Can. J. Genet. Cytol. 14: 773-783.
- 5) 中田和男・田中正雄 (1968). 蒴の組織培養による花粉からのタバコ幼植物の分化 遺殖 43: 65-71.

- 6) Niizeki, H. and K. Oono (1968). Induction of haploid rice plant from anther culture. *Proc. Japan Acad.* **44**: 554-557.
- 7) Niizeki, M. and F. Kita (1975). Production of aneuploid plants by anther culture in *Nicotiana tabacum* L. *Japan. J. Breed.* **25**: 52-58.
- 8) Nishiyama, I. and T. Taira (1966). The effect of kinetin and indoleacetic acid on culus growth and organ formation in two species of *Nicotiana*. *Japan. J. Genetics* **41**: 357-365.
- 9) 大野清香 (1975). イネの薬培養による半数体の作出とその育種的利用 農技研報告 D **26**: 139-222.
- 10) Shimada, T. and M. Tabata (1967). Chromosome numbers in cultured pith tissue of tobacco. *Japan. J. Genetics* **42**: 195-201.
- 11) Wang, C., C. Chu, C. Sun, S. Wu, K. Yin and C. Hsü (1973). The androgenesis in wheat (*Triticum aestivum*) anthers cultured *in vitro*. *Scientia Sinica* **16**: 218-222.